

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Helena Smolová

Mesenchymální kmenové buňky a jejich působení na regulační B lymfocyty
Mesenchymal stem cells and their effects on regulatory B cells

Bakalářská práce

Školitelka: Mgr. Pavla Boháčová
Konzultant: prof. RNDr. Vladimír Holáň, DrSc.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Helena Smolová

Poděkování

Děkuji své školitelce Mgr. Pavle Boháčové za ochotu, poskytnuté rady a věnovaný čas při vedení této bakalářské práce. Rovněž děkuji konzultantovi této práce prof. RNDr. Vladimíru Holáňovi, DrSc. za cenné rady a připomínky převážně po faktické stránce této práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu při studiu.

Abstrakt

Mesenchymální kmenové buňky (MSC) jsou multipotentní buňky schopné regulace reaktivity buněk imunitního systému. Regulační B lymfocyty (Bregs) se také podílejí na modulaci imunitních reakcí. Oba tyto typy buněk jsou schopny tvořit protizánětlivé a tolerogenní prostředí a představují možnost buňkami zprostředkované terapie autoimunitních onemocnění a transplantačních reakcí. Působení MSC na aktivaci a funkce Bregs je studováno až v posledních letech a nejsou zatím jednoznačně charakterizovány mechanismy, jakými na indukci Bregs působí. V přítomnosti MSC byl prokázán pokles efektorových B lymfocytů a tvorby protilátek. Vedle toho byla pozorována podpora aktivace populace Bregs produkujících protizánětlivý interleukinu 10. Různé molekuly produkované MSC se podílejí na indukci Bregs. Jejich vliv však nebyl ještě dostatečně charakterizován a odlišné modely ukazují nejednotné výsledky. Vedle aktuálně probíhajících studií v experimentálních modelech byly zahájeny i klinické testy. V obou případech byly pozorovány pozitivní výsledky, které naznačují možnosti budoucího využití Bregs pro léčbu autoimunitních onemocnění i transplantačních reakcí.

Klíčová slova:

regulační B lymfocyty, mesenchymální kmenové buňky, imunomodulace, autoimunitní onemocnění, cytokiny, IL-10

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent cells with the ability to regulate reactivity of cells of immune system. Regulatory B cells (Bregs) are also capable of modulating immune responses. Both these cell types are able of creating anti-inflammatory and tolerogenic environments and represent potential of cell-mediated therapy for autoimmune diseases and transplantation reactions. The effect of MSC on Bregs activation and function has been only studied in recent years, and mechanisms of their effects are not yet well characterized. However, studies have demonstrated a decrease in effector B lymphocytes and antibody production, and a support of activation of Bregs subpopulation and increased production of anti-inflammatory interleukin 10. Various molecules produced by MSC are involved in Bregs induction. Unfortunately, their effects have not yet been sufficiently described, and different models yields diverse results. In addition to the current studies in experimental models, the first clinical trials on Bregs have been initiated. The positive results suggesting the potential for future use of Bregs for the treatment of autoimmune diseases and transplantation reactions have been obtained in both cases.

Key words:

regulatory B cells, mesenchymal stem cells, immunomodulation, autoimmune diseases, cytokines, IL-10

Obsah

Seznam použitých zkratk	1
1. Úvod	4
2. Regulační B lymfocyty	5
2.1. Charakteristika Bregs	5
2.2. Mechanismy působení Bregs	6
3. Mesenchymální kmenové buňky	9
3.1. Charakteristika MSC	9
3.2. Znaky MSC	10
3.3. Imunomodulační vlastnosti MSC	11
4. Působení MSC na funkce buněk imunitního systému	13
4.1. Vliv MSC na buňky nespecifické imunity	14
4.1.1. Vliv MSC na dendritické buňky	14
4.1.2. Vliv MSC na NK buňky	14
4.1.3. Vliv MSC na makrofágy	14
4.2. Vliv MSC na buňky specifické imunity	15
4.2.1. Vliv MSC na T lymfocyty	15
4.2.2. Působení MSC na B lymfocyty	16
5. Působení MSC na aktivaci Bregs	19
5.1. Mechanismy působení MSC na aktivaci Bregs	21
5.2. Experimentální modely působení MSC na aktivaci a funkce Bregs	23
6. Závěr	26
7. Použitá literatura	27

Seznam použitých zkratk

AD-MSC – mesenchymální kmenové buňky izolované z tukové tkáně (*adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*)

BCR – receptor B buněk (*B-cell receptor*)

Blimp-1 – protein-1 vyvolávající zrání B lymfocytů (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*)

BM-MSC – mesenchymální kmenové buňky izolované z kostní dřeně (*bone marrow-derived mesenchymal stem cells*)

Bregs – regulační B buňky (*regulatory B cells*)

CD – diferenciační antigen (*cluster of differentiation*)

cGVHD – chronická reakce štěpu proti hostiteli (*chronic graft-versus-host disease*)

CIA – kolagenem vyvolaná artritida (*collagen-induced arthritis*)

Cox – cyklooxygenáza (*cyclooxygenase*)

CTLA-4 – cytotoxický antigen asociovaný s T lymfocyty 4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*)

EAE – experimentální autoimunitní encefalomyelitida (*experimental autoimmune encephalomyelitis*)

EBI3 – gen 3 vyvolaný virem Epstein-Barrové (*Epstein-Barr virus induced gene 3*)

FasL – Fas ligand (*Fas ligand*)

Foxp3 – transkripční faktor forkhead box protein 3 (*forkhead box protein 3*)

GITRL – ligand receptoru faktoru nekrotizující nádory aktivovaného glukokortikoidy (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein ligand*)

GVHD – reakce štěpu proti hostiteli (*graft-versus-host disease*)

HLA – lidský leukocytární antigen (*human leukocyte antigen*)

hUC-MSC – lidské mezenchymální kmenové buňky odvozené od pupečníku (*human umbilical chord-derived mesenchymal stem cells*)

IDO – indolamin-2,3-dioxygenáza (*indoleamine-2,3-dioxygenase*)

IFN – interferon (*interferon*)

Ig – imunoglobulin (*immunoglobulin*)

IL – interleukin (*interleukin*)

LPS – lipopolysacharid (*lipopolysaccharide*)

MSC –mesenchymální kmenové buňky (*mesenchymal stem cells*)

NK – přirozený zabíječ (*natural killer*)

PD-L – ligand programované buněčné smrti (*programmed cell death-ligand*)

PGE2 – prostaglandin E2 (*prostaglandin E2*)

SDF – faktor stromálních buněk (*stromal derived factor*)

SLE – systémový lupus erythematosus (*systemic lupus erythematosus*)

Tc – cytotoxické T buňky (*cytotoxic T cells*)

TGF – transformující růstový faktor (*transforming growth factor*)

Th – pomocné T buňky (*helper T cells*)

TLR – receptory skupiny toll (*toll-like receptors*)

T-MSC – mezenchymální kmenové buňky odvozené od krčních mandlí (*tonsil-derived mesenchymal stem cells*)

TNF – faktor nekrotizující nádory (*tumor necrosis factor*)

TRAIL – ligand indukující apoptózu příbuzný s faktorem nekrotizujícím nádory (*tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand*)

Tregs – regulační T buňky (*regulatory T cells*)

Trp – tryptofan (*tryptophan*)

TSG-6 – gen 6 stimulovaný faktorem nekrotizujícím nádory (*tumor necrosis factor-stimulated gene-6*)

UC-MSC – mezenchymální kmenové buňky odvozené od pupečníku (*umbical chord-derived mesenchymal stem cells*)

1. Úvod

Regulační B buňky (Bregs, *regulatory B cells*) jsou podskupinou B lymfocytů bez jasné definovaného fenotypu, ale se společnou regulační funkcí. Svou aktivitou jsou schopné ovlivňovat funkce dalších buněk imunitního systému, a tím se podílejí na tvorbě tolerogenního prostředí v organismu. Díky svým regulačním schopnostem představují možný terapeutický prostředek pro inhibici transplantačních reakcí nebo léčbu autoimunitních onemocnění.

Mesenchymální kmenové buňky (MSC, *mesenchymal stem cells*) jsou multipotentní buňky schopné diferenciaci v buňky mesodermální buněčné linie, ale i transdiferenciaci v jiné buněčné typy. Rovněž jsou schopné modulovat průběh imunitních reakcí působením na vývoj a funkce imunitních buněk. Byl popsán jejich vliv na aktivitu složek přirozené i adaptivní imunity. Produkci různých regulačních faktorů, expresí povrchových molekul a buněčným kontaktem mohou regulovat imunitní reakce a většinou napomáhají tvořit protizánětlivé a tolerogenní prostředí. Pro svou schopnost snižovat zánětlivý stav byly MSC testovány jako možné buněčné terapeutikum při zánětlivých onemocněních, jako jsou alergie, autoimunitní nemoci i transplantační reakce.

Nedávno začal být studován i vliv MSC na aktivaci a funkce Bregs a vedle *in vitro* a *in vivo* experimentů na modelových organismech začalo probíhat i několik klinických studií. MSC byly schopné podpořit vývoj Bregs i jejich imunomodulační účinky. Tento účinek má možné využití pro inhibici zánětlivých stavů organismu.

Cíly této bakalářské práce jsou:

- shrnout současně známé poznatky o vlivu MSC na aktivaci a funkce Bregs,
- popsat v současnosti charakterizované mechanismy působení MSC na indukci Bregs,
- zrekapitulovat experimentální studie a modely, ve kterých je působení MSC na aktivaci a funkce Bregs testováno.

2. Regulační B lymfocyty

Bregs představují heterogenní skupinu buněk s různým fenotypem, mechanismy účinku a místem působení v organismu (Ray & Dittel, 2017). Regulačního působení slezinných B lymfocytů na imunitní reakce bylo popsáno už v roce 1974 na modelu opožděného typu hypersenzitivní reakce u morčat. Po odstranění B buněk nebylo možné hypersenzitivní reakci dostatečně potlačit, což naznačovalo, že pro její inhibici jsou B lymfocyty nezbytné (Neta & Salvin, 1974).

U Bregs není známa žádná charakteristická molekula, jakou je u regulačních T buněk (Tregs, *regulatory T cells*) transkripční faktor forkhead box protein 3 (Foxp3, *forkhead box protein 3*), je proto pravděpodobné, že Bregs nejsou samostatná populace buněk, ale vznikají z efektorových B buněk pomocí stimulace (Rosser & Mauri, 2015). Tomu nasvědčuje i fakt, že regulační účinky mohou mít B buňky v různých stádiích vývoje a byly tak nalezeny i regulační plasmatické buňky schopné produkovat interleukin 35 (IL, *interleukin*) i IL-10 a potlačovat jimi zánět. Bregs vznikají v modelu artritidy jako odezva na IL-6 i IL-1 β . V modelu experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE, *experimental autoimmune encephalomyelitis*) jsou Bregs indukovány IL-21, který produkují T buňky pozitivní na diferenciální antigen 4 (CD, *cluster of differentiation*) ve slezině. Důležitá byla i stimulace přes receptor B buněk (BCR, *B-cell receptor*), při jehož blokaci docházelo ke snížení vývoje Bregs (Rosser & Mauri, 2015). Diferenciace Bregs pak může být stimulována působením přes receptory skupiny toll (TLR, *toll-like receptors*), CD40 nebo přes BCR (Mauri & Bosma, 2012). Vývoj Bregs a jejich produkce IL-10 byly ovlivňovány cytokiny, kdy interferon γ (IFN, *interferon*) a IL-12 podporovaly vývoj Bregs a tvorbu IL-10, zatímco IL-21 a transformující růstový faktor β (TGF, *transforming growth factor*) vývoj Bregs inhibovaly (Holan et al., 2014; Yoshizaki et al., 2012). V myším modelu kolitidy bylo zjištěno, že při chronických zánětech podporovala v B buňkách schopnost inhibovat zánět vyvolaný pomocnými T buňkami 2 (Th, *helper T cells*) zvýšená exprese CD1d podporou produkce IL-10 (Mizoguchi et al., 2002).

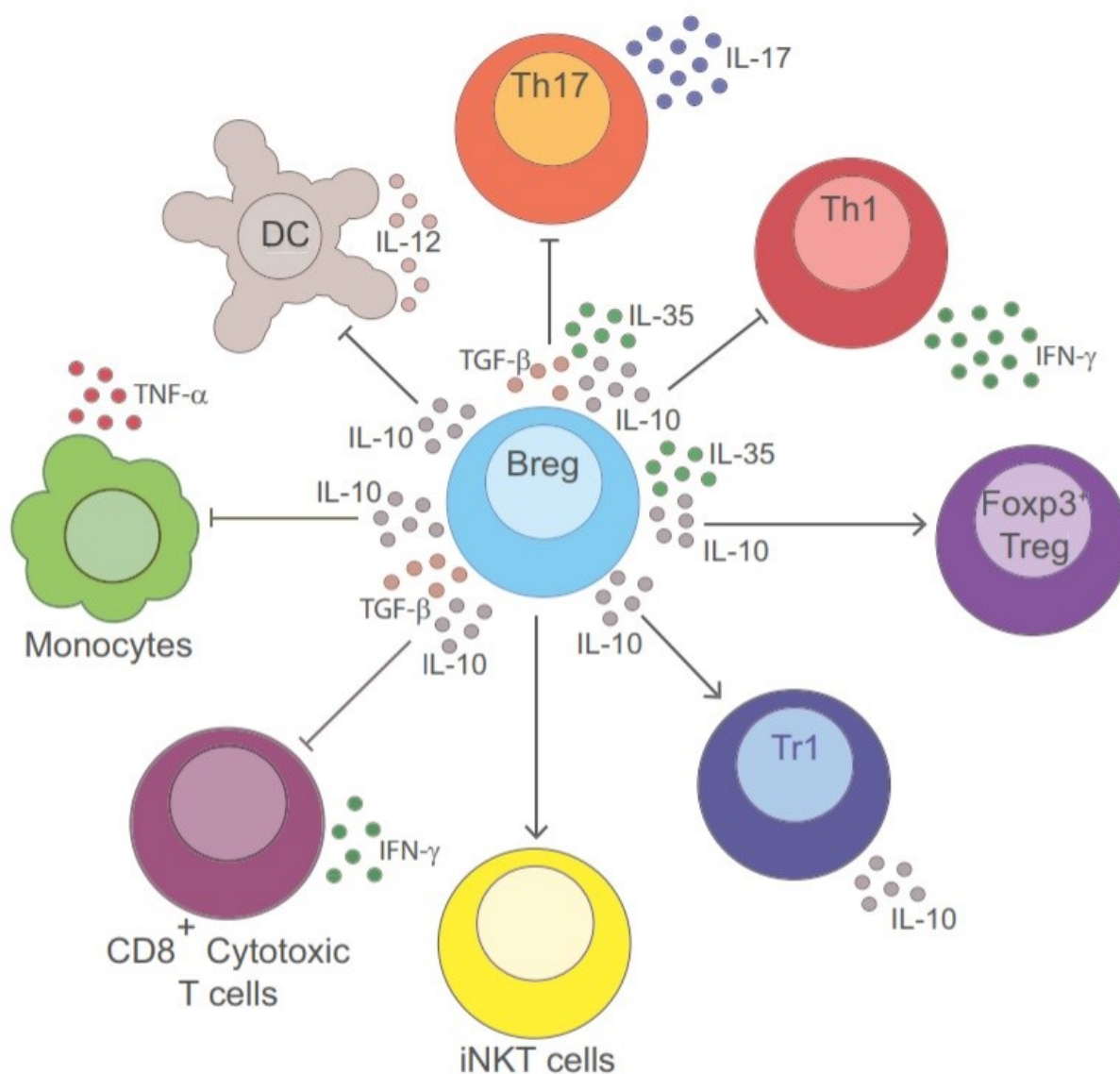
2.1. Charakteristika Bregs

Jako heterogenní skupinu je Bregs obtížné charakterizovat (Ray & Dittel, 2017). Není dán jasný fenotyp, který by Bregs popsal, většinou bývají rozpoznávány podle schopnosti exprese a produkce IL-10 a takové buňky byly nazývány B10 buňky (Rosser & Mauri, 2015). B10 B buňky tvoří u myši 1-3 % slezinných B buněk, u lidí byly v periferní krvi nalezeny v

podílu méně než 1 % B buněk. Frekvence B10 buněk byla výrazně vyšší u pacientů s autoimunitními chorobami (Iwata et al., 2011). Jako Bregs se pak například často označují $CD5^+$ B lymfocyty (Chao et al., 2016), u myši jsou známy například $CD1d^{high}CD5^+$ B buňky (Yanaba et al., 2008), B buňky marginální zóny, transientní-2 prekursor marginální zóny (T2-MZP), B buňky pozitivní na T buněčný imunoglobulin mucin 1 a třeba i $CD138^+$ plazmatické buňky (Rosser & Mauri, 2015). U lidí jsou pak známy lidské Bregs periferní krve jako $CD24^{high}CD27^+$ buňky, u kterých se zvýšila exprese CD25 a CD19. Polovina těchto Bregs exprimovala imunoglobulin M (Ig, *immunoglobulin*) a snížené množství IgD (Iwata et al., 2011). Jako další lidské Bregs byly popsány $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$ buňky (Blair et al., 2010). U pacientů s transplantovanou ledvinou bylo v periferní krvi zjištěno, že B buňky, které se později staly tolerogenními, měly zvýšenou expresi 3 genů (IGKV 4-1, IGLL1 a IGKV1D-13) (Franquesa et al., 2012).

2.2. Mechanismy působení Bregs

Bregs inhibují nádorové, autoimunitní a transplantační reakce různými mechanismy. Nejlépe prozkoumaným mechanismem působení Bregs na jiné imunitní buňky je produkce IL-10. Jeho produkce byla podpořena zánětlivými cytokiny IFN- γ , IL-21 a IL-12 (Holan et al., 2014; Yoshizaki et al., 2012), nebo stimulací přes BCR či CD40 (Klinker & Lundy, 2012). Prostřednictvím IL-10 mohou Bregs suprimovat zánět, což bylo prokázáno v několika experimentálních modelech, jako jsou modely artritidy, kolitidy a EAE (Rosser & Mauri, 2015). Jejich působením byla potlačena diferenciací Th1 buněk (Blair et al., 2010), snížena produkce zánětlivých cytokinů u buněk prezentujících antigen, jako jsou faktor nekrotizující nádory α (TNF, *tumor necrosis factor*) a IL-1 β (Klinker & Lundy, 2012) a podpořena diferenciací Tregs (Rosser & Mauri, 2015), když IL-10 zvyšoval expresi Foxp3 a cytotoxického antigenu asociovaného s T lymfocyty 4 (CTLA-4, *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) (Kessel et al., 2012). Podpora diferenciací Tregs díky zvýšení exprese Foxp3 a CTLA-4 byla zprostředkována i další molekulou, která je produkována Bregs a to TGF- β (Kessel et al., 2012). TGF- β vedle toho potlačoval proliferaci $CD4^+$ i $CD8^+$ T buněk. Produkce TGF- β mohla být zvýšena po stimulaci Bregs pomocí lipopolysacharidu (LPS, *lipopolysaccharide*) (Rosser & Mauri, 2015). Bregs produkují i IL-35, který snížil počet Th1 lymfocytů i makrofágů ve slezině. IL-35 může stimulovat další Bregs k produkci IL-35 a IL-10 (Rosser & Mauri, 2015). Mechanismy působení faktorů produkovaných Bregs na imunitní buňky jsou schematicky znázorněny na obr. 1.



Obr. 1: Působení Bregs na buňky imunitního systému produkcí rozpustných molekul.

Produkcí IL-10, TGF- β a IL-35 mohou Bregs inhibovat diferenciaci a funkci prozánětlivých buněk, jako TNF- α produkující monocyty, DC produkující IL-12, Th1 a Tc buňky a jejich produkci IFN- γ a Th17 buňky produkující IL-17. Bregs mohou produkcí stejných molekul indukovat diferenciaci Foxp3⁺ Tregs a Tr1 buněk a jejich produkcí IL-10 podporují udržování iNKT.

Šipka označuje stimulaci, slepá čára inhibici. (Převzato z Rosser & Mauri, 2015).

iNKT cells – invariantní NK T buňky (*invariant natural killer T cells*); Tr1 – regulační T buňky 1 (*T regulatory 1 cells*)

Vedle produkce solubilních molekul Bregs exprimují i povrchové molekuly, kterými ovlivňují imunitní reakce. Jednou z exprimovaných molekul je Fas ligand (FasL, *Fas ligand*), který po navázání na Fas receptor na cílových buňkách spouští apoptózu (Klinker & Lundy, 2012). Exprese FasL byla podpořena cytokiny IL-4 a IL-10. Vazbou FasL na Fas byly inhibovány efektorové T lymfocyty, čímž se zlepšily projevy autoimunitních onemocnění (Mauri & Bosma, 2012). Vedle exprese FasL mohla být apoptóza buněk imunitního systému vyvolaná i expresí ligandu indukujícím apoptózu příbuzným s faktorem nekrotizujícím nádory (TRAIL, *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) (Klinker & Lundy, 2012). Exprese TRAIL na B lymfocytech byla vyvolána ligandy TLR9, IFN- α nebo LPS a k jejímu zvýšení docházelo po stimulaci molekuly CD40. Další možnost ovlivnění imunitních mechanismů představuje exprese ligandů programované buněčné smrti 1 (PD-L, *programmed cell death-ligand*) a PD-L2 na Bregs (Klinker & Lundy, 2012). V supresi imunitních reakcí mají odlišné role a odlišuje se i způsob jejich aktivace. PD-L1 byl exprimován po stimulaci IFN- γ a reguloval Th1 buněčnou odpověď. Exprese PD-L2 byla stimulovaná cytokiny IL-4 a IL-13 a účastnila se potlačení Th2 reakcí (Klinker & Lundy, 2012). Další exprimovanou povrchovou molekulou Bregs, která se účastnila imunoregulace byl ligand receptoru faktoru nekrotizující nádory aktivovaného glukokortikoidy (GITRL, *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein ligand*) (Ray et al., 2012). Tento ligand interagoval s GITR na T lymfocytech, čímž pomáhal udržovat hladinu Tregs. Tento mechanismus byl potvrzen blokací GITRL, kdy se snížil počet Tregs (Ray et al., 2012).

Bregs inhibují zánětlivé reakce u autoimunitních onemocnění. Tyto účinky byly studovány například u vlivu na systémový lupus erythematosus (SLE, *systemic lupus erythematosus*), EAE, kolagenem vyvolanou artritidu (CIA, *collagen-induced arthritis*), roztroušenou sklerózu, kolitidu a dalších modelech (Mauri & Bosma, 2012). Po odstranění Bregs z organismu docházelo k rozvinutí symptomů autoimunitních chorob, deplece všech B lymfocytů, včetně efektorových, autoimunitní onemocnění potlačovala (Matsushita et al., 2008). Bregs přispívaly k udržení rovnováhy imunitních reakcí, která je potřebná k toleranci vlastních buněk (Mauri & Bosma, 2012).

Bregs jsou subpopulací B lymfocytů, které jsou charakterizovány společnými imunomodulačními vlastnostmi. Produkci solubilních molekul, jako IL-10, IL-35 nebo TGF- β i expresí povrchových molekul jako FasL, TRAIL a dalších jsou schopné suprimovat zánětlivé prostředí a napomáhat obnovení rovnováhy reakcí imunitního systému.

3. Mesenchymální kmenové buňky

MSC jsou multipotentní nehematopoetické kmenové buňky, které jsou kromě sebeobnovy a diferenciací v buňky mesodermální buněčné linie schopné ovlivňovat zrání a funkce imunitních buněk. Pro jejich schopnost imunomodulace jsou studovány v *in vitro* i *in vivo* experimentech zaměřených na jejich využití v potlačení autoimunitních, transplantačních nebo alergických onemocnění (Le Blanc, 2006).

3.1. Charakteristika MSC

MSC byly popsány v 60. letech minulého století, jako buňky v kostní dřeni, které byly schopny diferencovat v osteocyty (Friedenstein et al., 1966). Výskyt MSC v těle je však daleko rozmanitější a mohou být izolovány z různých tkání a orgánů. Typickými zdroji MSC jsou kostní dřev (BM-*MSC, bone marrow-derived mesenchymal stem cells*), tuková tkáň (AD-*MSC, adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*), pupeční šňůra a pupečnicková krev (UC-*MSC, umbilical chord-derived mesenchymal stem cells*) (Ding et al., 2011), krční mandle (T-*MSC, tonsil-derived mesenchymal stem cells*) (Cho et al., 2017) nebo periferní krev (Park et al., 2015). Mohou být izolovány i z kloubních vazů (Ding et al., 2011), sleziny, jater, ledvin, plic, svalů, brzlíku a slinivky břišní (da Silva Meirelles et al., 2006). Vzhledem k místům izolace se jako nejméně invazivní zdají UC-*MSC*, které lze získat po porodu a pro budoucí využití uchovávat zmražené. Takto získané a uchované UC-*MSC* jsou však při použití alogenní (Baksh et al., 2007). Ideální pro získání autologních MSC jsou pak AD-*MSC*, které jsou snadno dostupné a například oproti BM-*MSC* je jejich izolace minimálně invazivní (Park et al., 2015).

Všechny takto získané MSC jsou schopny sebeobnovy a diferenciací v různé buňky mesodermální linie (da Silva Meirelles et al., 2006). Vedle typické diferenciací v osteoblasty, adipocyty a chondroblasty (Dominici et al., 2006) se mohou *in vitro* diferencovat v buňky šlach a svalů (Pittenger et al., 1999) a za specifických podmínek i na neurony, jaterní buňky a buňky pankreatických ostrůvků (Ding et al., 2011). V kostní dřeni BM-*MSC* jako nehematopoetické kmenové buňky chrání jiné kmenové buňky, v tkáních napomáhají regeneraci a hojení (Le Blanc, 2006).

Pro zjištění, jestli mají MSC získané z jiných tkání než kostní dřev, ze které byly MSC izolovány jako první, stejné vlastnosti a funkce, byly porovnány UC-*MSC* s BM-*MSC* (Baksh et al., 2007). Lidské MSC odvozené od pupečníku (hUC-*MSC, human umbilical chord-derived mesenchymal stem cells*) byly schopny diferenciací v osteocyty, chondrocyty a adipocyty.

Diferenciace v osteocyty probíhala dokonce rychleji než u BM-MSc, UC-MSc měly tedy vyšší diferenciální potenciál. Ostatní účinky měly UC-MSc a BM-MSc srovnatelné. K terapeutickým účelům se tedy mohou použít UC-MSc stejně jako BM-MSc, navíc jsou snadněji přístupné a dají se i snadněji *in vitro* kultivovat. Jejich nevýhodou však zůstává to, že se nedají izolovat z dospělého organismu a při použití jsou alogenní (Baksh et al., 2007)

3.2. Znaky MSC

Jednotlivé studie zaměřené na MSC charakterizovaly jejich povrchové znaky. Bylo ukázáno, že MSC exprimují nízké hladiny lidského leukocytárního antigenu (HLA, *human leukocyte antigen*) a díky tomu jsou málo imunogenní (Le Blanc et al., 2003). MSC byly pozitivní na CD29, CD44, CD71, CD90, CD124 a další, ale negativní na CD14, CD34 a CD45, což jsou typické znaky hematopoetických kmenových buněk (Pittenger et al., 1999). Podobných výsledků bylo dosaženo i v jiných studiích, ve kterých MSC exprimovaly CD105 a CD146, ale hematopoetické znaky jako CD14, CD34, CD45 a HLA II. třídy neexprimovaly (Ding et al., 2011).

Při vzrůstajícím zájmu o studium MSC stanovila komise mezinárodní společnosti pro buněčnou terapii minimální kritéria pro definování lidských MSC, která by měla usnadnit jejich charakterizaci a porovnávání výsledků jednotlivých studií (Dominici et al., 2006). Stanovená kritéria byla následující:

1. Při standardní kultivaci musí být MSC adherentní k plastovým povrchům.
2. Alespoň 95 % kultury MSC musí na svém povrchu exprimovat CD105, CD73 a CD90 a exprese molekul CD45, CD34, CD14, CD11b, CD97 α , CD19 a HLA II. třídy nesmí být na více než 2 % populace.
3. MSC musí být *in vitro* schopny diferenciace v osteoblasty, adipocyty a chondroblasty.

Tato kritéria musí být splněna v nestimulovaném stavu, jelikož MSC stimulované pomocí IFN- γ zahajují expresi HLA II. třídy (Dominici et al., 2006). Populace, které splňují tato kritéria bývají stále heterogenní skupinou nehematopoetických kmenových buněk (Lee & Song, 2018).

3.3. Imunomodulační vlastnosti MSC

MSC jsou známy svou schopností ovlivňovat buňky adaptivní i nespecifické imunity, a to v pozitivním i negativním smyslu. Jejich působení je dále ovlivněno cytokinovým prostředím (Holan et al., 2016). Imunomodulační účinky MSC mohou být zesíleny prozánětlivými cytokiny, nejčastějšími jsou IFN- γ , TNF- α a IL-1 β (Lee & Song, 2018). Stimulace může probíhat i přímo prostřednictvím TLR, které rozpoznávají potenciálně nebezpečné struktury (English, 2013). Imunomodulační účinky mohou být zprostředkovány přímým buněčným kontaktem MSC s imunitními buňkami, nebo prostřednictvím imunomodulačních faktorů, které jsou pomocí MSC produkovány (Lee & Song, 2018). Mezi faktory, které k imunomodulaci slouží, patří TGF- β , indolamin-2,3-dioxygenáza (IDO, *indoleamine-2,3-dioxygenase*) (Le Blanc, 2006), IL-10, růstový faktor hepatocytů (Ryan et al., 2007), IL-6 (Svobodova et al., 2011), gen 6 stimulovaný faktorem nekrotizujícím nádory (TSG-6, *tumor necrosis factor-stimulated gene-6*), oxid dusnatý, cyklooxygenáza 1 (Cox, *cyclooxygenase*) i Cox-2, díky jejichž aktivitě vzniká imunomodulační faktor prostaglandin E2 (PGE2, *prostaglandin E2*). Další možností ovlivnit imunitní buňky je pomocí PD-L1 a Fas/FasL molekul, které spouští v imunitních buňkách apoptózu (English, 2013). Imunomodulačních účinků se účastnily *in vitro* i extracelulární vezikuly sekretované z MSC. Ve směsi buněk periferní krve měly vezikuly největší účinek na monocyty, které nejlépe vezikuly vázaly. V kulturách s jednotlivými imunitními buňkami však byly schopny potlačovat funkce i B lymfocytů a přirozených zabíječů (NK, *natural killer*). Účinnost extracelulárních vezikulů se zatím zdá jako možná alternativa pro terapii bez použití samotných MSC (Di Trapani et al., 2016).

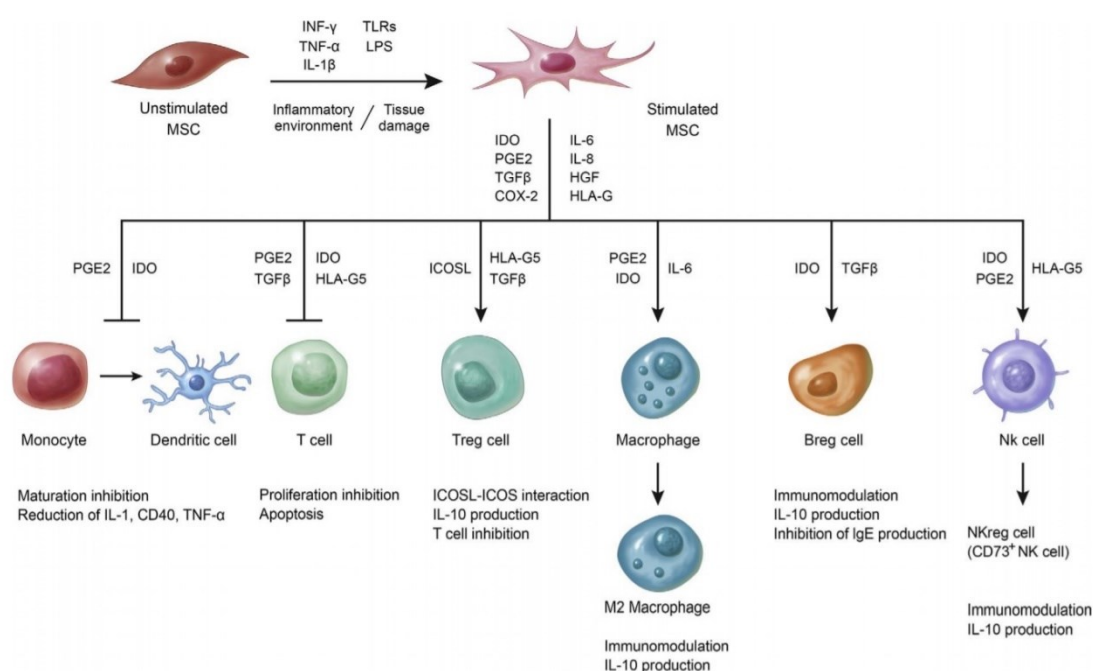
Využitelnost MSC při potlačení autoimunitních reakcí ukazuje schopnost snižovat nebo omezovat zánětlivé reakce a podporovat protizánětlivé mechanismy (Aggarwal & Pittenger, 2005). Vedle toho aktivované MSC indukovaly tvorbu regulačních buněk a tím tvořily tolerogenní prostředí. Účinek MSC byl pozorován potlačením zánětu u *in vivo* zvířecích modelů reakce štěpu proti hostiteli (GVHD, *graft-versus-host disease*), EAE, SLE, Crohnovy choroby, diabetes mellitus 1. typu, atopické dermatitidy, akutní pankreatitidy, roztroušené sklerózy a mnoha dalších (English, 2013; Lee & Song, 2018). Ve většině modelů měla terapie MSC na potlačení onemocnění pozitivní účinky (Lee & Song, 2018). *In vivo* byly MSC schopny migrovat k místu zánětu (Na et al., 2014), kam byly atrahovány chemokiny, složkami komplementu C3a, C5a a dalšími faktory (English, 2013).

MSC jsou svými imunomodulačními účinky schopné podporovat tolerogenní prostředí a potlačovat zánět. Toho je využíváno ve studiích, které účinek MSC sledují v modelech autoimunitních onemocnění, nebo nežádoucích reakcích způsobené transplantacemi. V experimentech měly MSC na léčbu pozitivní vliv a neobjevovaly se negativní účinky jejich použití, mechanismus jejich účinku však nebyl vždy jasně charakterizován. V nedávné době byly zahájeny i klinické studie. Pro uvedení buněčné terapie do klinické praxe budou nezbytné další testy s prokazatelnými účinky (Lee & Song, 2018).

4. Působení MSC na funkce buněk imunitního systému

Imunomodulační vliv MSC na různé populace buněk imunitního systému je hojně studován. MSC by mohly být využívány pro buněčnou terapii různých onemocnění a poruch.

MSC působí na buňky imunitního systému různými mechanismy, včetně indukce tolerogenních buněk. Vliv MSC na imunitní buňky je schematicky znázorněn na obr. 2.



Obr. 2: Schématické znázornění působení MSC na buňky imunitního systému.

MSC sekretují molekuly, které mohou působit na imunitní buňky. MSC obecně inhibují efektorové imunitní buňky a stimulují regulační a tolerogenní imunitní buňky. Imunomodulační působení MSC vyvolává inhibici T buněčné proliferace, indukci M2 typu makrofágů, Bregs a Tregs, supresi zrání a funkcí DC a modulaci aktivity NK buněk. MSC tak navozují v tkáni tolerogenní prostředí a tím umožňují potlačení transplantačních reakcí i autoimunitních chorob.

Šipka označuje stimulaci, slepá čára inhibici (Převzato z Lee & Song, 2018).

ICOSL – ligand receptoru ICOS (*ICOS ligand*), NKreg cell – regulační NK buňka (*regulatory NK cell*)

4.1. Vliv MSC na buňky nespecifické imunity

MSC mají vliv na buňky nespecifické části imunitního systému. MSC ve většině případů podporují změnu fenotypu imunitní buňky na protizánětlivý nebo tolerogenní typ.

4.1.1. Vliv MSC na dendritické buňky

MSC potlačují funkce DC (Corcione et al., 2006) a silně inhibují generování DC z monocytů periferní krve (Spaggiari et al., 2009). Vlivem MSC se snižuje exprese znaků jako MHC II, CD40, CD86 a CD80. Působením MSC je inhibována i produkce prozánětlivých cytokinů IL-12 a TNF- α (English, 2013). Jejich působením dochází také k potlačení exprese kostimulačních molekul (Lee & Song, 2018) a snížení schopnosti stimulovat proliferaci a aktivaci T lymfocytů (Spaggiari et al., 2009). Vlivem MSC je podpořen vznik DC s protizánětlivým fenotypem a podpořena sekrece protizánětlivých cytokinů, jako IL-10 (Aggarwal & Pittenger, 2005; English, 2013). Zvyšuje se i fagocytická aktivita a schopnost *in vitro* stimulovat Tregs (English, 2013).

MSC jsou schopné suprimovat prozánětlivé DC a tím snižovat tvorbu prozánětlivých cytokinů, jako IL-12 a TNF- α a inhibovat stimulaci T lymfocytů. Současně podporují tvorbu protizánětlivého fenotypu DC, čímž zvyšují produkci IL-10, fagocytickou aktivitu a schopnost indukovat Tregs (English, 2013).

4.1.2. Vliv MSC na NK buňky

MSC inhibují proliferaci NK buněk, potlačují i jejich efektorové funkce, jako jsou cytotoxická aktivita a produkce cytokinů, hlavně prozánětlivého IFN- γ (Aggarwal & Pittenger, 2005; Spaggiari et al., 2008). Inhibiční efekt souvisí s potlačením povrchové exprese aktivačních receptorů NK buněk (NKp30, NKp44, NKG2D). MSC také snižují cytotoxickou aktivitu NK buněk a inhibují produkci IL-2. Buněčným kontaktem s MSC NK buňky exprimují molekulu CD73, CD73⁺ NK buňky představují podmnožinu regulačních NK buněk s imunomodulačními účinky (Lee & Song, 2018).

4.1.3. Vliv MSC na makrofágy

MSC svým působením podporují indukci protizánětlivého M2 typu makrofágů namísto prozánětlivého M1 typu, čímž se sníží produkce IL-6 a IL-1 β a zvýší produkce IL-10 (Dayan et al., 2011). Vedle toho MSC zvyšují fagocytickou aktivitu makrofágů (English, 2013) a

schopnost inhibice T lymfocytů, což ještě víc podpoří imunosupresivní účinky MSC (Lee & Song, 2018).

4.2. Vliv MSC na buňky specifické imunity

Vedle regulace funkce buněk nespecifické části imunitního systému jsou MSC schopny ovlivňovat i reaktivitu buněk specifické imunity. Buněčná populace modulovaná působením MSC pak může svým působením ovlivňovat další buňky imunitního systému, což nepřímo zesiluje imunomodulační efekt MSC.

4.2.1. Vliv MSC na T lymfocyty

Vliv MSC na T lymfocyty se zdá být důležitý, jelikož T lymfocyty mohou způsobovat některá autoimunitní onemocnění i reakce spojené s transplantacemi. Modulace T lymfocytů pomocí MSC byla proto často studována a je stále oblastí zájmu výzkumu.

In vitro funkce a proliferace efektorových $CD4^+$ i $CD8^+$ T lymfocytů byly vlivem MSC potlačovány. Také *in vivo* byly pozorovány protizánětlivé účinky (Le Blanc, 2006; Corcione et al., 2006), byla snížena produkce $IFN-\gamma$ a IL-4 (Na et al., 2014). MSC měnily poměr zastoupení Th1 a Th2 buněk a tím i jimi produkované cytokiny. V zánětlivém prostředí byla produkcí cytokinů podpořena proliferace Th2 buněk a produkce IL-4 a IL-10, která tak inhibovala Th1 odpověď a utlumila zánět i produkci $IFN-\gamma$ a $TNF-\alpha$. V případě Th17 odpovědi byly Th17 buňky rovněž inhibovány na úkor Th2, nebo Tregs (English, 2013). Zvětšování populace Tregs na úkor efektorových T lymfocytů bylo při výzkumu působení MSC časté a snižovaly se díky tomu projevy autoimunitních chorob (Chao et al., 2016; English et al., 2009).

MSC jsou svým působením schopné inhibovat T buňky i tím, že zastavují buněčný cyklus v G1/G0 fázi a brání přechodu do S fáze (Lee & Song, 2018). Zvýšení populace $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs na úkor Th17 buněk bylo zprostředkováno potlačením exprese receptoru kyseliny retinové souvisejícím s orphan receptorem γt (ROR γt) a indukcí exprese Foxp3 (Zhang et al., 2018). Vzájemná regulace diferenciaci Th17 doprovázená produkcí IL-17 a diferenciaci Tregs za exprese molekuly Foxp3 byla ovlivněna cytokinovým prostředím. Zvýšená produkce TGF- β vedla k diferenciaci Tregs, zatímco produkce zároveň TGF- β i IL-6 podporovala diferenciaci prozánětlivých Th17 buněk (Svobodova et al., 2011).

Imunomodulačních účinků se účastní i extracelulární vezikuly odvozené z MSC. Přímý efekt na T buňky *in vitro* nebyl pozorován, ale přítomnost T buněk zlepšovala imunosupresivní

účinek na B buňky, nebo NK buňky. Použití vezikulů odvozených od MSC by mohla být užitečná varianta terapie zánětlivých onemocnění bez použití buněk (Di Trapani et al., 2016). To bylo ukázáno i u *in vivo* experimentu, kdy v modelu CIA u myší inhibovaly extracelulární vezikuly izolované z MSC proliferaci lymfocytů. Snižovalo se i procento CD4⁺ i CD8⁺ T buněk. Exosomy zvyšovaly populaci Tregs, zatímco přímo MSC na tuto populaci neměly vliv. Vezikuly izolované z MSC po působení IFN- γ měly nezměněný imunomodulační účinek, zatímco MSC v mediu s IFN- γ se chovaly odlišně, z toho vyplývá, že aktivované MSC vylučují rozpustný faktor, který ale není obsažen ve vezikulech (Cosenza et al., 2018).

V nedávné studii byly sledovány účinky samotného kondiciovaného média získaného kultivací T-MSC. V myším modelu s GVHD byla zvýšena exprese molekul CD4. Přidáním kondiciovaného média získaného z kultivace T-MSC se exprese CD4 snížila. Analýzou bylo zjištěno, že médium obsahuje protein TSG-6. TSG-6 ovlivňoval i migraci lymfocytů, která je řízena chemotakticky, protože se vázal na chemokiny a tím omezoval jejich vliv. Stejný vliv má kondiciované médium z MSC a s TSG-6 i na B lymfocyty (Cho et al., 2019).

MSC inhibovaly vznik efektorových Th buněk i cytotoxických T buněk (Tc, *cytotoxic T cells*) a podporovaly proliferaci T lymfocytů s regulačním účinkem. V důsledku toho MSC potlačovaly zánětlivé reakce, ve kterých hrají efektorové T lymfocyty roli. Dochází tedy k supresi autoimunitních chorob i transplantačních reakcí (English, 2013). V nedávné době bylo zjištěno, že stejný efekt může být zprostředkován i extracelulárními vezikuly izolovanými z MSC (Cosenza et al., 2018), nebo kondiciovaným médiem, ve kterém byly MSC kultivovány (Cho et al., 2019). To nabízí možnost léčby zánětlivých onemocnění i bez přítomnosti samotných buněk.

4.2.2. Působení MSC na B lymfocyty

V těle se MSC setkávají s B lymfocyty na různých místech, jako je kostní dřeň, lymfatické uzliny nebo krční mandle (da Silva Meirelles et al., 2006). Studium vlivu MSC na B buňky ukazuje potlačení diferenciaci B lymfocytů v plasmatické buňky a podporu tvorby subpopulace Bregs. To by mohlo být prospěšné pro léčbu autoimunitních onemocnění a inhibici nežádoucích reakcí spojených s transplantacemi.

Zrání B lymfocytů a produkci protilátek podporují různé molekuly, mezi které patří protein-1 vyvolávající zrání B lymfocytů (Blimp-1, *B lymphocyte-induced maturation protein-1*) (Shapiro-Shelef et al., 2003). Snížením exprese tohoto proteinu může docházet k potlačení

proliferace a diferenciaci B buněk, které jsou stimulovány antigeny závislými i nezávislými na T lymfocytech. Vlivem snížení exprese Blimp-1 docházelo i k inhibici terminální diferenciaci v plasmatické buňky. Humorální faktory produkované MSC suprimují i produkci antigenně specifických IgG1 a IgM. Zmenšení počtu plasmatických buněk v *in vitro* kultuře s MSC tak nebylo způsobeno jejich apoptózou, ale tím, že nedošlo k jejich diferenciaci (Asari et al., 2009). Potlačení exprese Blimp-1 a tím snížení produkce IgE B buňkami bylo pozorováno i v *in vivo* studii u myši s atopickou dermatitidou, kterým byly MSC podány intravenózní injekcí. Vlivem inhibice B buněk, ale i T buněk v této studii docházelo ke klinickému zlepšení projevů tohoto onemocnění (Na et al., 2014). Snížením hladiny sérového IgE byla navíc suprimována degranulace mastocytů, která je vyvolaná právě přítomností IgE, což také napomáhalo klinickému zlepšení ve stejném modelu. Mechanismem účinku MSC v tomto modelu byla určena exprese Cox-2, jejímž působením byla zvýšena hladina PGE2, který se účastnil inhibice (Shin et al., 2017).

Dalším mechanismem *in vitro* suprese proliferace B buněk pomocí MSC bylo, podobně jako u T buněk, zastavení v G1/G0 fázi buněčného cyklu (Corcione et al., 2006), vlivem toho byla snížena i produkce protilátek (Lee & Song, 2018). Účinek MSC na snížení tvorby protilátek byl pozorován i v laboratorních testech na potkanech, kteří byli senzitivizováni krví potkana jiného kmene. MSC redukovaly produkci IgG1, IgG2a i IgG2c, ale neovlivňovaly hladiny IgG2b a IgM. Vliv jen na některé druhy protilátek mohl být ovlivněn načasováním terapie vzhledem ke zrání plasmatických buněk (Zhang et al., 2018). Působení MSC na B lymfocyty bylo zprostředkované i sclerostinem (Yee et al., 2018). Sclerostin je negativní regulátor tvorby kostí, který je exprimován osteocyty (van Bezooijen et al., 2004). Odstranění sclerostinu z kostní dřene bránilo zrání B lymfocytů, způsobovalo tak tvorbu abnormálních B lymfocytů, které nejsou schopny exprese IgM a IgD, ale jinak se mohou jevit fenotypově zralé (Yee et al., 2018). MSC podporovaly přežití B buněk i mechanismem závislým na kontaktu. AD-MSC jím tlumily diferenciaci B lymfocytů v plasmatické buňky produkující protilátky. MSC inhibovaly diferenciaci B buněk, které byly stimulovány antigeny závislými i nezávislými na T lymfocytech, ale není jisté, jestli MSC působily přímo na B buňky, nebo prostřednictvím T buněk jako intermediátů (Franquesa et al., 2015).

Působení extracelulárních vezikulů izolovaných z MSC bylo společně s vlivem na T lymfocyty pozorováno i u B lymfocytů. V *in vitro* studii měly extracelulární vezikuly na B lymfocyty supresivní účinek, snižovaly jejich zrání a produkci protilátek. Imunosupresivní vliv byl navíc podpořen v přítomnosti T lymfocytů. Ve směsné kultuře s jinými buňkami periferní

krve byl účinek omezen, jelikož vezikuly působily nejvíce na monocyty, které je lépe vázaly (Di Trapani et al., 2016). Možnost využití jen extracelulárních vezikulů namísto MSC pro terapeutické účely pak byla studována i *in vivo*, kde byla jejich působením potlačena diferenciace plasmatických buněk (Cosenza et al., 2018).

Studie zabývající se vlivem kondiciovaného média získaného z kultivace s MSC v myším modelu s GVHD, probíhala společně na B i T lymfocytech. V tomto modelu byla u B lymfocytů zvýšena exprese molekul CD19. Přidáním kondiciovaného média získaného z kultivace T-MSC se exprese CD19 snížila. Stejně jako potlačení exprese CD4 u T lymfocytů byla i inhibice CD19 u B lymfocytů zprostředkována proteinem TSG-6, který ovlivňoval i migraci B lymfocytů tím, že blokoval chemokiny, jenž podporovaly migraci do místa poškození (Cho et al., 2019).

Působením MSC na aktivitu B lymfocytů docházelo k supresi proliferace B lymfocytů, inhibici terminální diferenciace v plasmatické buňky a snížení produkce protilátek (Asari et al., 2009). K potlačení docházelo různými mechanismy. Stejně jako u T buněk byl účinek na B buňky studován i jen prostřednictvím extracelulárních vezikulů odvozených od MSC (Cosenza et al., 2018) a kondiciovaného média získaného kultivací MSC (Cho et al., 2019). V obou případech zůstával účinek stejný jako u samotných MSC a k inhibici proliferace a diferenciace B buněk tedy docházelo i bez přítomnosti MSC.

5. Působení MSC na aktivaci Bregs

Působení MSC na aktivaci a funkce Bregs je studováno až v posledních letech. To pravděpodobně způsobuje nejednotnost dosažených výsledků, které se odlišují v závislosti na rozdílných přístupech izolace a kultivace MSC (Franquesa et al., 2012). Slibným terapeutickým přístupem se jeví možnost aktivace populace Bregs využitím MSC, což by mohlo být využito zejména při léčbě autoimunitních onemocnění nebo inhibici transplantačních reakcí (Park et al., 2015).

U myšího modelu experimentální kolitidy bránily hUC-MSC před rozvojem onemocnění zvýšeným zastoupením CD5⁺ B buněk, které produkovaly IL-10, a ovlivňovaly poměr Tregs/Th17/Th1 (Chao et al., 2016). Kokultivace hUC-MSC a myších splenocytů zvýšila počet CD5⁺ B buněk, které bývají označovány jako subpopulace Bregs, a došlo k inhibici proliferace T buněk. Bregs podporovaly Th buňky a Tregs, inhibovaly Tc buňky a NK buňky (Chao et al., 2016). Ke zvětšení populace Bregs produkujících IL-10 vedla i *in vitro* kultivace lidských AD-MSC s myšími splenocyty. Vývoj populace Bregs se v této kultuře ještě zesílil při současném použití LPS (Park et al., 2015). Podobně AD-MSC podporovaly diferenciaci Bregs produkujících IL-10 z lidských B lymfocytů izolovaných z krčních mandlí a zároveň došlo k potlačení diferenciaci těchto B buněk na plasmatické buňky. AD-MSC dále potlačovaly proliferaci B buněk. Tento efekt byl závislý na přítomnosti CD4⁺ Th lymfocytů v kultuře, AD-MSC proliferaci B lymfocytů tedy ovlivňovaly nepřímě (Franquesa et al., 2015). Následně bylo prokázáno, že k diferenciaci Bregs z jaderných buněk periferní krve příjemce transplantované ledviny došlo i po kultivaci s AD-MSC dárce. To dokládá klinický potenciál MSC pro přípravu Bregs, které by mohly být využitelné pro oslabení odhojovacích reakcí (Gupte et al., 2017). Studie vlivu MSC na chronické reakci štěpu proti hostiteli (cGVHD, *chronic graft-versus-host disease*) pak porovnála *in vitro* chování Bregs a ukázala, že Bregs izolované z krve zdravých dárců a jedinců s cGVHD reagovaly odlišně. U zdravých jedinců byla pro produkci IL-10 prostřednictvím CD5⁺ Bregs nutná aktivace *ex vivo* pomocí LPS. Bregs pacientů s cGVHD produkovaly IL-10 bez aktivace a po *ex vivo* působení LPS dokonce ztrácely schopnost regulace a produkce IL-10. MSC pak *in vitro* zvyšovaly populaci CD5⁺ Bregs podporou jejich přežívání a proliferace (Peng et al., 2015). Mírné zvýšení zastoupení CD24^{high}CD38^{high} B lymfocytů s regulačním účinkem bylo zjištěno i v klinické studii zabývající se pacienty s osteoartritidou. Po aplikaci intrakloubní injekce autologních AD-MSC

došlo u pacientů k podpoře vývoje populace Bregs a zároveň nebyl pozorován vliv na jiné populace B buněk (Pers et al., 2018).

Ačkoliv v některých z dříve zmíněných studií byly testovány účinky lidských MSC v myším modelu, nedávná studie ukazuje, že použití xenogenních MSC nemusí mít dostatečný imunomodulační účinek (Lohan et al., 2018). V potkaním modelu s alogenní transplantací rohovky bylo zjištěno, že aplikací lidských MSC nedocházelo k inhibici proliferace T lymfocytů, ani nebyla snižována produkce prozánětlivých cytokinů. Mezidruhová nekompatibilita cytokinů způsobila, že potkaní IFN- γ nebyl schopen u lidských MSC vyvolat zvýšení exprese HLA molekul. Působením potkaních cytokinů MSC neprodukovaly imunomodulační molekuly. Kvůli tomu docházelo po podání lidských MSC k rejekci alotransplantátu stejně jako bez aplikace MSC. Podání potkaních MSC tlumilo transplantační reakce a podpořilo přežití alotransplantátů. Tato studie ukázala možný problém studia účinku xenogenních buněk a výsledky těchto studií nemusí mít pro možné budoucí klinické testy vypovídající hodnotu (Lohan et al., 2018).

Imunomodulační působení MSC na subpopulace B lymfocytů bylo testováno i dalšími autory, kteří zjistili, že aktivita MSC je ovlivněna cytokinovým prostředím (Hermankova et al., 2016; Holan et al., 2016; Luk et al., 2017). Pokud byly MSC kultivovány s IFN- γ , byla produkce IL-10 B buňkami snížena. K tomu došlo i v případě, že MSC byly s IFN- γ pouze preinkubovány. V následné kultuře s B buňkami MSC také potlačovaly vývoj IL-10⁺ B lymfocytů. Jestliže byly MSC a B buňky odděleny v transwell systému, inhibiční vliv preinkubovaných MSC pomocí IFN- γ byl potlačen (Hermankova et al., 2016). V podobné studii bylo ukázáno, že MSC v klidových podmínkách bez působení exogenních cytokinů neovlivnily proliferaci B buněk, ale zvyšovaly populaci CD38^{high}CD24^{high} B buněk s regulačním potenciálem a produkci IL-10, což přispívalo k udržení homeostázy (Luk et al., 2017). Simulací zánětlivých podmínek působením IFN- γ na AD-MSK bylo zjištěno, že takové MSC naopak výrazně potlačovaly diferenciaci B buněk a inhibovaly produkci IgG, ale jejich působením nedocházelo ke změnám v populacích Bregs ani v produkci IL-10. MSC v zánětlivém prostředí pravděpodobně potlačovaly proliferaci všech subpopulací B lymfocytů. Za klidových podmínek tedy MSC stimulovaly indukci Bregs, ale při zánětlivých stavech MSC inhibovaly proliferaci a zrání všech B buněk (Luk et al., 2017). Vliv na kulturu MSC s B lymfocyty měl i IL-4. Společná inkubace MSC, B buněk a IL-4 potlačovala produkci IL-10 B lymfocyty (Holan et al., 2016). Preinkubace MSC s IL-4 a následné přidání ovlivněných MSC k B buňkám sekreci IL-10 spíše podpořilo. Dalším rozdílem bylo, že IL-4 vyvolával expresi Fas molekul. Zapojení

Fas/FasL molekul může v MSC indukovat apoptózu, ale přidání neutralizačních anti-Fas protilátek do kultury s IL-4 neodvrátilo potlačení produkce IL-10. V závislosti na přijatém signálu na TLR a vlivem cytokinů se mohou MSC chovat buď pro-, nebo protizánětlivě. Takže obecně imunosupresivní MSC mohou mít inhibiční vliv i na imunosupresivní reakce imunitního systému (Holan et al., 2016). Toto podporuje myšlenku, že mechanismy imunosuprese, které jsou zprostředkovány MSC, jsou velice komplexní (Holan et al., 2016; English, 2013).

MSC působí na indukci a funkce Bregs především podporou jejich vývoje a proliferace (Chao et al., 2016; Park et al., 2015; Franquesa et al., 2015; Pers et al., 2018). Dále bylo zjištěno, že imunomodulační účinek MSC je ovlivňován cytokiny a je rozdílný, jestli v buněčném mikrostředí převažuje neutrální stav homeostázy, nebo je modulace MSC ovlivněna zánětlivou imunitní odpovědí. V neutrálním prostředí bez přítomnosti cytokinů MSC podporují vznik Bregs a jejich produkci IL-10, zatímco v přítomnosti zánětlivých cytokinů bylo pozorováno potlačení vývoje Bregs i produkce IL-10 (Hermankova et al., 2016; Holan et al., 2016), vedle toho i potlačení diferenciaci B lymfocytů v plasmatické buňky a snížení jejich produkce protilátek (Luk et al., 2017). Výsledky ukázaly, že MSC mohou být vhodné pro potlačení autoimunitních i transplantačních reakcí, které jsou ovlivňovány přítomností Bregs, a zlepšit tak možnost léčby těchto stavů. Před potenciální klinickou aplikací je však potřeba dalších testů a studií.

5.1. Mechanismy působení MSC na aktivaci Bregs

Mechanismy působení MSC na aktivaci Bregs nejsou ještě dostatečně charakterizovány. Některé studie již prokázaly molekuly, které se imunomodulace Bregs pomocí MSC mohou účastnit. Lepší pochopení mechanismů je v budoucnu nezbytné pro využití imunoregulačního vlivu MSC na Bregs v klinické praxi.

Pro zjištění vlivu T-MSC na autoimunitní poruchy byla indukována B buněčná odpověď pomocí estradiolu, který spouští aktivaci B buněk u myši (Cho et al., 2017). Podáním T-MSC do aktivovaných myši se zvýšila populace Bregs, které produkovaly IL-10, a zmírnila se imunitní reakce zprostředkovaná B lymfocyty. T-MSC sekretovaly IL-35, který je složený ze dvou heterogenních podjednotek, gen 3 vyvolaný virem Epstein-Barrové (EBI3, *Epstein-Barr virus induced gene 3*) a IL-12p35. K potlačení B buněčné odpovědi i indukci diferenciaci Bregs byla vyžadována přítomnost EBI3. Kultivací B buněk s IL-35 došlo k nárůstu IL-35⁺ Bregs, u kterých polovina této populace exprimovala vedle IL-35 i IL-10. Mediátorem vlivu T-MSC na

B buňky je pravděpodobně IL-35 a jeho heterogenní podjednotky EBI3 a IL-12p35 (Cho et al., 2017).

V myším modelu s cGVHD bylo zjištěno, že MSC zvyšovaly zastoupení CD5⁺ Bregs díky podpoře jejich přežití a proliferace (Peng et al., 2015). Pokud byla inhibována IDO, podpora proliferace a přežití pomocí MSC byla částečně potlačena, ale nedošlo k ovlivnění produkce IL-10. Pro upřesnění mechanismů byly blokovány i jiné molekuly, které se účastní imunomodulačních účinků MSC, jako je Cox-2, PGE2, IL-6 a IL-10, ale inhibice žádné z těchto molekul nepotlačovala vliv MSC na rozšíření populace CD5⁺ B buněk a produkci IL-10. Je možné, že mechanismu působení se tak mohou účastnit i dosud nepopsané mediátory (Peng et al., 2015). Další studie ukázala, že MSC, které byly vystaveny IFN- γ , zvýšily produkci IDO. V přítomnosti IDO byla v kultuře snížena hladina tryptofanu (Trp, *tryptophan*), který je zodpovědný za podporu růstu B buněčných populací, což vedlo také k potlačení vývoje populace Bregs. Přidáním Trp do kultury docházelo opět ke zvýšené diferenciaci Bregs a produkci IL-10 (Luk et al., 2017). Vliv MSC na Bregs v přítomnosti IFN- γ byl pozorován už dříve (Hermankova et al., 2016). B lymfocyty aktivované pomocí LPS produkovaly IL-10 a efekt byl zvýšen přidáním IFN- γ . V kultuře MSC s B buňkami předem aktivovanými LPS neměly MSC významný vliv na produkci IL-10. Pokud byl do společné kultury MSC a B buněk přidán IFN- γ , produkce IL-10 B buňkami byla snížena. K potlačení produkce IL-10 došlo i pokud byly MSC předem aktivované v přítomnosti IFN- γ a následně přeneseny do kultury s B buňkami. Inhibice produkce IL-10 byla zprostředkována nepřímo pomocí MSC. Analýza genové exprese ukázala zvýšenou expresi genů pro IDO, Cox-2 a PD-L1 u MSC, na které působil IFN- γ . Pro zjištění, která z těchto molekul byla zodpovědná za potlačení produkce IL-10, byly postupně přidány inhibitory IDO, Cox-2 i PD-L1. Při použití indomethacinu, inhibitoru Cox-2, došlo k navrácení produkce IL-10 B buňkami. Bylo zjištěno, že snížení produkce IL-10 bylo způsobeno i přidáním PGE2, který vzniká během dráhy Cox-2, takže za potlačení produkce IL-10 B lymfocyty mohl být zodpovědný právě PGE2. Při oddělení MSC od B buněk v transwell systému byla produkce IL-10 obnovena, inhibice tedy vyžaduje blízkost buněk. Buněčný kontakt byl vyžadován pravděpodobně proto, že dostatečná koncentrace PGE2 byla jen v bezprostřední blízkosti MSC (Hermankova et al., 2016).

Imunomodulační účinek MSC na funkce a aktivaci Bregs negativně ovlivňovala i vysoká hladina faktoru stromálních buněk 1 α (SDF, *stromal derived factor*), která se váže na receptor CXCR7 na MSC (Qin et al., 2015). SDF-1 α je cytokin, který chemotakticky působí na lymfocyty a monocyty (Bleul et al., 1996). Jeho nízká hladina podporovala imunoregulační

působení MSC na diferenciaci Bregs, čímž docházelo ke vzniku zvýšeného počtu Bregs a jejich zesílené produkci IL-10 oproti kontrolnímu pozorování s vysokou hladinou SDF-1 α . Pokud však byla molekula SDF-1 α odstraněna z mikroprostředí B lymfocytů zvýšenou expresí receptoru CXCR7 na MSC, došlo k supresi efektu SDF-1 α a MSC podpořily diferenciaci Bregs i přes vysokou hladinu SDF-1 α (Qin et al., 2015).

Znalosti o mechanismech působení MSC na Bregs jsou zatím stále velmi omezené a neukazují jednoznačné výsledky. NapříkladIDO byla v jedné studii určena jako molekula podporující přežití a diferenciaci Bregs (Peng et al., 2015), zatímco v jiné, ve které byl sledován vliv IFN- γ na imunoregulační funkce MSC bylo zjištěno, že prostřednictvímIDO byl spotřebováván Trp, kvůli čemuž došlo ke zmenšení populace Bregs (Luk et al., 2017). Byl popsán i negativní vliv cesty Cox-2 a produkce PGE2 pomocí MSC a IFN- γ na vývoj Bregs (Hermankova et al., 2016). Inhibice indukce Bregs prostřednictvím MSC byla pozorována i v přítomnosti zvýšené exprese SDF-1 α (Qin et al., 2015). Naopak pozitivní vliv na indukci Bregs měla molekula EBI3, podjednotka IL-35 (Cho et al., 2017). Nejednotné výsledky mohou být dány odlišnými zdroji MSC a rozdílnými modely vlivu MSC na Bregs a tím souvisejícími odlišnými podmínkami kultivace, proto je v této oblasti nezbytný další výzkum.

5.2. Experimentální modely působení MSC na aktivaci a funkce Bregs

Vliv MSC na Bregs je experimentálně studován na myších modelech autoimunitních onemocnění a v posledních letech i v klinických studiích u pacientů, které sledují možné imunologické terapie využitelné pro mírnění transplantačních komplikací i autoimunitních nemocí.

Bylo prokázáno, že pro případnou buněčnou terapii je možné připravit Bregs *in vitro* pomocí lidských AD-MSC. Dalšího zvýšení množství generovaných Bregs bylo docíleno přidáním LPS získaného z *E. coli* (Gupte et al., 2017). AD-MSC podané *in vivo* infuzí do ocasní žíly myší měly relativně krátkou dobu přežití. Po 24 hodinách od infuze byly životaschopné MSC nalezeny pouze v plicích, ale nikoliv v játrech, slezině, ani ledvinách. Po více než 24 hodinách nebyly životaschopné MSC v organismu nalezeny (Eggenhofer, et al., 2012). V jiných studiích bylo pozorováno přežití MSC po delší dobu a to 6 týdnů po transplantaci v rohovce myší (Liu et al., 2012), nebo 8 týdnů v poraněné míše potkanů (Hu et al., 2012). Imunoregulační efekt krátce žijících MSC v organismu byl však udržován díky produkci IL-10 pomocí Bregs, které byly diferenciovány přímým působením MSC i nepřímě, prostřednictvím

dříve indukovaných CD4⁺ Th buněk. Právě indukované CD4⁺ Th buňky a jejich působení byly dalším prostředkem, pomocí kterého zůstával imunomodulační účinek MSC i přes jejich vymizení z organismu (Franquesa et al., 2015).

Vliv MSC na B lymfocyty byl často studován v myších modelech autoimunitních onemocnění. Podání lidských AD-MSK do ocasní žíly myším se SLE snižovalo hladinu sérových autoprotilátek a došlo k redukci patologie ledvin u těchto myší (Park et al., 2015). Dále byl zjištěn pokles výskytu folikulárních pomocných T buněk, Th1 a Th17 buněk, které se podílely na zánětlivé odpovědi, a nárůst počtu Tregs. Vlivem MSC byl snížen i počet a velikost germinálních center v sekundárních lymfatických orgánech a byl snížen počet efektorových B buněk. Ve slezině bylo zvýšeno množství Bregs (Park et al., 2015). Podobných výsledků bylo dosaženo i u léčby roztroušené sklerózy lidskými BM-MSK. Myši léčené pomocí lidských BM-MSK měly oproti neléčeným menší množství prozánětlivých Th17, ale zvýšené zastoupení Bregs. Zároveň u nich došlo ke snížení demyelinizace míchy (Guo et al., 2013). K výraznému zvýšení diferenciace Bregs docházelo i po podání BM-MSK potkanům, kteří byli předem senzitivizováni krevní transfusí z jiného potkaního kmene (Zhang et al., 2018). Senzitivizace na cizí antigeny simulovala situaci při transplantacích, kdy má příjemce předem protilátky proti antigenům dárce. Vedle podpory diferenciace Bregs byla potlačena proliferace folikulárních B lymfocytů a plasmatických buněk ve slezině. Tyto výsledky podporují možnost desenzitizace příjemců před transplantací a tím zamezení případného odhojení (Zhang et al., 2018). V *in vivo* studii na myších s experimentální kolitidou byl sledován i pohyb buněk pomocí značení luciferázou (Chao et al., 2016). MSC značené *in vitro* luciferázou byly podány peritoneálně, stejně byl injikován i luciferázový substrát a světelným systémem byly detekovány značené buňky. Bylo ukázáno, že hUC-MSK uplatňovaly své funkce specificky v zánětlivých oblastech. Při výplachu peritonea bylo zjištěno, že po přenosu hUC-MSK vzrostl počet CD5⁺ Bregs. Vyšší počet Bregs byl pozorován i ve slezině. Pro ověření, zda byly CD5⁺ Bregs spojeny s potlačením onemocnění byly myším s experimentální kolitidou následně přeneseny i samotné *in vitro* indukované Bregs. Jejich adoptivní přenos přinesl stejné výsledky, jako léčba pomocí hUC-MSK. Aplikace MSC a tím indukovaná diferenciace Bregs by tak mohla být novým prostředkem imunoterapie i u Crohnovy choroby (Chao et al., 2016).

Vedle vlivu samotných MSC bylo testováno i působení extracelulárních vezikulů sekretovaných z MSC (Cosenza et al., 2018). U myšího modelu CIA byl sledován jejich vliv na imunitní buňky. Protizánětlivé působení exosomů bylo spojeno s potlačením diferenciace plasmatických buněk a se zvýšením populace Bregs v lymfatických uzlinách, které

exprimovaly IL-10. Vlivem vezikulů nedocházelo v B buněčných populacích ke změně produkce cytokinů (Cosenza et al., 2018).

Na základě prokázání vlivu MSC na vývoj a proliferaci Bregs v myších modelech byly zahájeny navazující klinické studie. Ve studii, která sledovala vliv MSC na projevy nefrotického syndromu bylo ukázáno, že po infuzi MSC pacientům vzrostla populace $CD5^+IL-10^+$ Bregs a zvýšil se tak jejich poměr k běžným $CD19^+$ B lymfocytům. Současně s tím byl v séru pozorován pokles hladiny $TNF-\alpha$ i $IFN-\gamma$ a v periferní krvi byla zvětšena populace $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs (Zhang et al., 2017). V klinické studii u pacientů s remisí roztroušené sklerózy byl nárůst Bregs v periferní krvi vlivem intravenózního podání BM-MSK infuzí jen mírný. Bylo však potvrzeno snížení hladiny $IFN-\gamma$ a statisticky nevýznamně i pokles prozánětlivých Th1 a Th17 buněk. Ke změnám množství Tregs zde nedocházelo (Llufriu et al., 2014).

Ve studii analyzující možnost zamezení cGVHD u alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk bylo zjištěno, že pacienti s cGVHD měli sníženou aktivaci Bregs (Peng et al., 2015). Po podání MSC pacientům infusí, docházelo ke klinickému zlepšení symptomů cGVHD. Klinické zlepšení bylo pozorovatelné na kůži, ústní sliznici a v játrech. Zlepšení bylo doprovázeno vyšším počtem $CD5^+$ B buněk v periferní krvi a také jejich zvýšenou produkcí IL-10. Zvýšená produkce IL-10 byla spojena s nižší produkcí prozánětlivých cytokinů v T buňkách, převážně pak $TNF-\alpha$, který měl v cGVHD patogenní roli. MSC podporovaly přežití a diferenciaci $CD5^+$ Bregs, na těchto účincích se podílela IDO, jejíž inhibicí byla podpora diferenciaci Bregs potlačena. Pacienti s cGVHD pak měli po infuzi MSC vedle zvýšeného počtu Bregs i vyšší hladinu Tregs a nižší hladinu Th1/Th17 (Peng et al., 2015).

Experimentální studie vlivu MSC na Bregs u modelů autoimunitních chorob i transplantačních komplikací jak u myší, tak lidí ukazují, že podání MSC dochází ke zlepšení klinických projevů onemocnění na základě zvýšení expanze Bregs, případně zesílení jejich funkcí. Díky tomu se terapeutický potenciál MSC založený na jejich imunomodulačních vlastnostech jeví jako možnost pro budoucí použití i v klinické praxi. Pro reálné využití buněčné terapie pomocí MSC je ale nezbytný další výzkum.

6. Závěr

Bregs jsou v současné době studovány pro svou schopnost udržovat rovnováhu imunitních reakcí, suprimovat zánětlivé reakce a vytvářet tolerogenní prostředí v organismu. Jejich působením může docházet ke zlepšení průběhu autoimunitních onemocnění a oslabení transplantačních reakcí. Aktivace Bregs je možná přímým působením na TLR, BCR, nebo CD40 a zesílena prostřednictvím cytokinů, například IL-6, IL-21 a dalších. Podobný účinek na imunitní reakce mají i MSC, které svým působením rovněž tlumí zánětlivé reakce prostřednictvím inhibice efektorových buněk imunitního systému a aktivací jejich regulačních a tolerogenních subtypů. Jejich vliv na imunitní buňky je ovlivňován cytokinovým prostředím. Na regulaci imunitních reakcí byl pozorován i vliv vezikulů izolovaných z MSC i samotného kondicionovaného média bez nutnosti přítomnosti MSC.

Působení MSC na aktivaci a funkce Bregs je testováno až v posledních letech a mechanismy jejich působení ještě ve většině případů nejsou známy. Výsledky studií již ukazují, že MSC jsou schopné inhibovat funkce B lymfocytů a jejich diferenciaci v plasmatické buňky a potlačovat tvorbu protilátek. Vedle toho indukují aktivaci Bregs a jejich produkci IL-10. Mechanismy účinku MSC na funkce a indukcii Bregs nejsou jednoznačně charakterizovány. Indukční efekt na aktivaci měl IL-35 i jeho podjednotky. Inhibiční vliv na aktivaci Bregs pomocí MSC pak měla zvýšená produkce molekul SDF-1 α , nebo Cox-2 a její cestou vznikající PGE2. Molekula IDO měla ambivalentní efekt v různých studiích, kdy byla určena jako pozitivní i negativní regulátor diferenciaci Bregs v závislosti na konkrétní studii. Pozorované rozdíly mohou být způsobené rozdílnou izolací MSC i odlišnými modely studia. *In vivo* testy na myších modelech autoimunitních onemocnění ukazují pozitivní vliv na inhibici onemocnění a zmenšení jejich symptomů. V důsledku toho začaly probíhat i klinické studie zabývající se autoimunitními chorobami, nebo transplantačními reakcemi. MSC mají potenciál využití v buněčných terapiích, před běžnou aplikací v praxi budou nutné další a rozsáhlejší studie.

Tato bakalářská práce shrnuje současné poznatky o imunomodulačních účincích MSC na aktivaci a funkce Bregs. Jsou zde popsány mechanismy působení, které jsou v současnosti charakterizovány. Rovněž je shrnuto působení MSC na aktivaci a funkce Bregs v experimentálních modelech, včetně některých klinických studií, které jsou zatím testovány v malém rozsahu.

7. Použitá literatura

Aggarwal, S., & Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4), 1815-1822.

Asari, S., Itakura, S., Ferreri, K., Liu, C. P., Kuroda, Y., Kandeel, F., & Mullen, Y. (2009). Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Experimental hematology*, 37(5), 604-615.

Baksh, D., Yao, R., & Tuan, R. S. (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem cells*, 25(6), 1384-1392.

Blair, P. A., Noreña, L. Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D. J., Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R., & Mauri, C. (2010). CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients. *Immunity*, 32(1), 129-140.

Bleul, C. C., Fuhlbrigge, R. C., Casasnovas, J. M., Aiuti, A., & Springer, T. A. (1996). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *Journal of experimental medicine*, 184(3), 1101-1109.

Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G. L., Pistoia, V., & Uccelli, A. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 107(1), 367-372.

Cosenza, S., Toupet, K., Maumus, M., Luz-Crawford, P., Blanc-Brude, O., Jorgensen, C., & Noël, D. (2018). Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis. *Theranostics*, 8(5), 1399.

da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*, 119(11), 2204-2213.

Dayan, V., Yannarelli, G., Billia, F., Filomeno, P., Wang, X. H., Davies, J. E., & Keating, A. (2011). Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction. *Basic research in cardiology*, 106(6), 1299-1310.

Di Trapani, M., Bassi, G., Midolo, M., Gatti, A., Kamga, P. T., Cassaro, A., Casuone, R., Adamo, A., & Krampera, M. (2016). Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions. *Scientific reports*, 6, 24120.

*Ding, D. C., Shyu, W. C., & Lin, S. Z. (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell transplantation*, 20(1), 5-14.

Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.

Eggenhofer, E., Benseler, V., Kroemer, A., Popp, F., Geissler, E., Schlitt, H., Baan, C. C., Dahlke, M. H., & Hoogduijn, M. J. (2012). Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Frontiers in immunology*, 3, 297.

English, K., Ryan, J. M., Tobin, L., Murphy, M. J., Barry, F. P., & Mahon, B. P. (2009). Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4⁺CD25^{High} forkhead box P3⁺ regulatory T cells. *Clinical & experimental immunology*, 156(1), 149-160.

*English, K. (2013). Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunology and cell biology*, 91(1), 19-26.

*Franquesa, M., Hoogduijn, M. J., Bestard, O., & Grinyó, J. M. (2012). Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells. *Frontiers in immunology*, 3, 212.

Franquesa, M., Mensah, F. K., Huizinga, R., Strini, T., Boon, L., Lombardo, E., DelaRosa, O., Laman, J. D., Grinyó, J. M., Weimar, W., Betjes, M. G. H., Baan, C. C., & Hoogduijn, M. J. (2015). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells abrogate plasmablast formation and induce regulatory B cells independently of T helper cells. *Stem cells*, 33(3), 880-891.

Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., & Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Development*, 16(3), 381-390.

Guo, Y., Chan, K. H., Lai, W. H., Siu, C. W., Kwan, S. C., Tse, H. F., Wing-Lok Ho, P., & Wing-Man Ho, J. (2013). Human mesenchymal stem cells upregulate CD1d^{high}CD5⁺ regulatory B cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroimmunomodulation*, 20(5), 294-303.

Gupte, K. S., Vanikar, A. V., Trivedi, H. L., Patel, C. N., & Patel, J. V. (2017). In-vitro generation of interleukin-10 secreting B-regulatory cells from donor adipose tissue derived mesenchymal stem cells and recipient peripheral blood mononuclear cells for potential cell therapy. *Biomedical journal*, 40(1), 49-54.

Hermankova, B., Zajicova, A., Javorkova, E., Chudickova, M., Trosan, P., Hajkova, M., Krulova, M., & Holan, V. (2016). Suppression of IL-10 production by activated B cells via a cell contact-dependent cyclooxygenase-2 pathway upregulated in IFN- γ -treated mesenchymal stem cells. *Immunobiology*, 221(2), 129-136.

Holan, V., Zajicova, A., Javorkova, E., Trosan, P., Chudickova, M., Pavlikova, M., & Krulova, M. (2014). Distinct cytokines balance the development of regulatory T cells and interleukin-10-producing regulatory B cells. *Immunology*, 141(4), 577-586.

Holan, V., Hermankova, B., Bohacova, P., Kossel, J., Chudickova, M., Hajkova, M., Krulova, M., Zajicova, A., & Javorkova, E. (2016). Distinct immunoregulatory mechanisms in mesenchymal stem cells: role of the cytokine environment. *Stem cell reviews and reports*, 12(6), 654-663.

Hu, S. L., Lu, P. G., Zhang, L. J., Li, F., Chen, Z., Wu, N., Meng, H., Lin, J. K., & Feng, H. (2012). In vivo magnetic resonance imaging tracking of SPIO-labeled human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*, 113(3), 1005-1012.

Chao, K., Zhang, S., Qiu, Y., Chen, X., Zhang, X., Cai, C., Peng, Y., Mao, R., Pevsner-Fischer, M., Ben-Horin, S., Elinav, E., Zeng, Z., Chen, B., He, Y., Xiang, A. P., & Chen, M. (2016). Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells protect against experimental colitis via CD5⁺ B regulatory cells. *Stem cell research & therapy*, 7(1), 109.

Cho, K. A., Lee, J. K., Kim, Y. H., Park, M., Woo, S. Y., & Ryu, K. H. (2017). Mesenchymal stem cells ameliorate B-cell-mediated immune responses and increase IL-10-expressing regulatory B cells in an EBI3-dependent manner. *Cellular & molecular immunology*, 14(11), 895.

Cho, K. A., Kim, Y. H., Park, M., Kim, H. J., Woo, S. Y., Park, J. W., & Ryu, K. H. (2019). Conditioned medium from human palatine tonsil mesenchymal stem cells attenuates acute graft-vs.-host disease in mice. *Molecular medicine reports*, 19(1), 609-616.

Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., DiLillo, D. J., Yanaba, K., Venturi, G. M., Szabolcs, P. M., Bernstein, S. H., Magro, C. M., Williams, A. D., Hall, R. P., St Clair, E. W., & Tedder, T. F. (2011). Characterization of a rare IL-10–competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, 117(2), 530-541.

Kessel, A., Haj, T., Peri, R., Snir, A., Melamed, D., Sabo, E., & Toubi, E. (2012). Human CD19⁺CD25^{high} B regulatory cells suppress proliferation of CD4⁺ T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmunity reviews*, 11(9), 670-677.

*Klinker, M. W., & Lundy, S. K. (2012). Multiple mechanisms of immune suppression by B lymphocytes. *Molecular medicine*, 18(1), 123-137.

Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., & Ringdén, O. (2003). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental hematology*, 31(10), 890-896.

*Le Blanc, K. (2006). Mesenchymal stromal cells: tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy*, 8(6), 559-561.

*Lee, D. K., & Song, S. U. (2018). Immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Cellular immunology*, 326, 68-76.

Liu, H., Zhang, J., Liu, C. Y., Hayashi, Y., & Kao, W. W. Y. (2012). Bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate and assume corneal keratocyte phenotype. *Journal of cellular and molecular medicine*, 16(5), 1114-1124.

Llufriu, S., Sepúlveda, M., Blanco, Y., Marín, P., Moreno, B., Berenguer, J., Gabilondo, I., Martínez-Heras, E., Sola-Valls, N., Arnaiz, J. A., Andreu, E. J., Fernández, B., Bullich, S., Sánchez-Dalmau, B., Graus, F., Villoslada, P., & Saiz, A. (2014). Randomized placebo-controlled phase II trial of autologous mesenchymal stem cells in multiple sclerosis. *PloS one*, 9(12), e113936.

Lohan, P., Treacy, O., Morcos, M., Donohoe, E., O'donoghue, Y., Ryan, A. E., Elliman, S. J., Ritter, T., & Griffin, M. D. (2018). Interspecies incompatibilities limit the immunomodulatory effect of human mesenchymal stromal cells in the rat. *Stem cells*, 36(8), 1210-1215.

Luk, F., Carreras-Planella, L., Korevaar, S. S., de Witte, S. F., Borràs, F. E., Betjes, M. G. H., Baan, C. C., Hoogduijn, M. J., & Franquesa, M. (2017). Inflammatory conditions dictate the effect of mesenchymal stem or stromal cells on B cell function. *Frontiers in immunology*, 8, 1042.

Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Fujimoto, M., & Tedder, T. F. (2008). Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *The journal of clinical investigation*, 118(10), 3420-3430.

*Mauri, C., & Bosma, A. (2012). Immune regulatory function of B cells. *Annual review of immunology*, 30, 221-241.

Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R. S., & Bhan, A. K. (2002). Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*, 16(2), 219-230.

Na, K., Yoo, H. S., Zhang, Y. X., Choi, M. S., Lee, K., Yi, T. G., Song, S. U., & Jeon, M. S. (2014). Bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells inhibit ovalbumin-induced atopic dermatitis. *Cell death & disease*, 5(7), e1345.

Neta, R., & Salvin, S. B. (1974). Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity. *The journal of immunology*, 113(6), 1716-1725.

Park, M. J., Kwok, S. K., Lee, S. H., Kim, E. K., Park, S. H., & Cho, M. L. (2015). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce expansion of interleukin-10-producing regulatory B cells and ameliorate autoimmunity in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Cell Transplantation*, 24(11), 2367-2377.

Peng, Y., Chen, X., Liu, Q., Zhang, X., Huang, K., Liu, L., Li, H., Zhou, M., Huang, F., Fan, Z., Sun, J., Liu, Q., Ke, M., Li, X., Zhang, Q., & Xiang, A. P. (2015). Mesenchymal stromal cells infusions improve refractory chronic graft versus host disease through an increase of CD5⁺ regulatory B cells producing interleukin 10. *Leukemia*, 29(3), 636.

- Pers, Y. M., Quentin, J., Feirreira, R., Espinoza, F., Abdellaoui, N., Erkilic, N., Cren, M., Dufourcq-Lopez, E., Pullig, O., Nöth, U., Jorgensen, C., & Luis-Plence, P. (2018). Injection of adipose-derived stromal cells in the knee of patients with severe osteoarthritis has a systemic effect and promotes an anti-inflammatory phenotype of circulating immune cells. *Theranostics*, 8(20), 5519.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147.
- Qin, Y., Zhou, Z., Zhang, F., Wang, Y., Shen, B., Liu, Y., Guo, Y., Fan, Y., & Qiu, J. (2015). Induction of regulatory B-cells by mesenchymal stem cells is affected by SDF-1 α -CXCR7. *Cellular physiology and biochemistry*, 37(1), 117-130.
- Ray, A., Basu, S., Williams, C. B., Salzman, N. H., & Dittel, B. N. (2012). A novel IL-10–independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand. *The journal of immunology*, 188(7), 3188-3198.
- *Ray, A., Dittel, B. (2017). Mechanisms of regulatory B cell function in autoimmune and inflammatory diseases beyond IL-10. *Journal of clinical medicine*, 6(1), 12.
- *Rosser, E. C., & Mauri, C. (2015). Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*, 42(4), 607-612.
- Ryan, J. M., Barry, F., Murphy, J. M., & Mahon, B. P. (2007). Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical & experimental immunology*, 149(2), 353-363.
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K. I., McHeyzer-Williams, L. J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M. G., & Calame, K. (2003). Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity*, 19(4), 607-620.
- Shin, T. H., Lee, B. C., Choi, S. W., Shin, J. H., Kang, I., Lee, J. Y., Kim, J. J., Lee, H. K., Jung, J. E., Choi, Y. W., Lee, S. H., Yoon, J. S., Choi, J. S., Lee C. S., Seo, Y., Kim, H. S., & Kang, K. S. (2017). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis via regulation of B lymphocyte maturation. *Oncotarget*, 8(1), 512.

- Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*, 111(3), 1327-1333.
- Spaggiari, G. M., Abdelrazik, H., Becchetti, F., & Moretta, L. (2009). MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*, 113(26), 6576-6583.
- Svobodova, E., Krulova, M., Zajicova, A., Pokorna, K., Prochazkova, J., Trosan, P., & Holan, V. (2011). The role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naive T-cells into anti-inflammatory regulatory T-cell or proinflammatory helper T-cell 17 population. *Stem cells and development*, 21(6), 901-910.
- van Bezooijen, R. L., Roelen, B. A., Visser, A., van der Wee-pals, L., de Wilt, E., Karperien, M., Hamersma, H., Papapoulos, S. E., ten Dijke, P., & Löwik, C. W. G. M. (2004). Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *Journal of experimental medicine*, 199(6), 805-814.
- Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Haas, K. M., Poe, J. C., Fujimoto, M., & Tedder, T. F. (2008). A regulatory B cell subset with a unique CD1d^{hi}CD5⁺ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*, 28(5), 639-650.
- Yee, C. S., Manilay, J. O., Chang, J. C., Hum, N. R., Muruges, D. K., Bajwa, J., Mendez, M.E., Economides, A. E., Horan, D. J., Robling, A. G., & Loots, G. G. (2018). Conditional deletion of *Sost* in MSC-derived lineages identifies specific cell-type contributions to bone mass and B-cell development. *Journal of bone and mineral research*, 33(10), 1748-1759.
- Yoshizaki, A., Miyagaki, T., DiLillo, D. J., Matsushita, T., Horikawa, M., Kountikov, E. I., Spolski, S., Poe, J. C., Leonard, W. J., & Tedder, T. F. (2012). Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature*, 491(7423), 264.
- Zhang, X., Peng, Y., Fan, Z., Zhao, K., Chen, X., Lin, R., Sun, J., Wang, G., Xiang, A. P., & Liu, Q. (2017). Mesenchymal stem cells may ameliorate nephrotic syndrome post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation-case report. *Frontiers in immunology*, 8, 962.

Zhang, Z., Wilson, N. A., Chinnadurai, R., Panzer, S. E., Redfield III, R. R., Reese, S. R., Galipeau, J., & Djamali, A. (2018). Autologous mesenchymal stromal cells prevent transfusion-elicited sensitization and upregulate transitional and regulatory B cells. *Transplantation direct*, 4(9).

(* označuje sekundární zdroje)